

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月20日現在

機関番号：12102
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659063
 研究課題名（和文）化学物質過敏症を呈する親電子物質に対する感知・応答の防御システムの探索
 研究課題名（英文）Exploration of a system for cellular response to the electrophiles exhibiting skin sensitization potential
 研究代表者
 熊谷 嘉人 (KUMAGAI YOSHITO)
 筑波大学・医学医療系・教授
 研究者番号：00250100

研究成果の概要（和文）：本研究では解離性アミノ基と共有結合を形成する親電子物質のモデル化合物として 3,4-ジヒドロクマリン (3,4-DHC) を用い、本化合物の水溶液中における反応性の検討や 3,4-DHC を特異的に認識する抗体の作製を行った。その結果、3,4-DHC は水溶液中において水解され 3-(2-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸 (HPA) に変換されるが、リジンおよびヒスチジン存在下において、その一部は結合体を形成することが分かった。また、3,4-DHC-KLH 結合体を調製後、当該抗原をウサギに感作させることにより、抗体価の高い抗 3,4-DHC 抗体を作製することができた。本抗体は解離性アミノ基を有するセンサータンパク質を探索する際に有用である。

研究成果の概要（英文）：3,4-dihydrocoumarin (3,4-DHC) is known to be a potent skin sensitizer that has electrophilic property to form a covalent bond with deprotonated amino groups. Incubation of 3,4-DHC in aqueous solution resulted in hydrolysis to form 3-(2-hydroxyphenyl)propanoic acid (HPA) and formation of 3,4-DHC-lysine adduct in the presence of lysine. Also, LC-MS analysis showed that 3,4-DHC modified lysine residues in KLH. By using such a 3,4-DHC-KLH adduct, we prepared the polyclonal antibody against 3,4-DHC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：環境医学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：化学物質過敏症、3,4-ジヒドロクマリン、アミノ基、共有結合

1. 研究開始当初の背景

親電子物質は分子内に電子密度の低い炭素原子を持つため、感知・応答センサーのような解離性 SH 基および解離性 NH₂ 基を有するタンパク質に共有結合する性質を有する。タンパク質のこのような化学修飾は細胞への有害作用とこれまで解釈されてきたが、我々は細胞内シグナル伝達において重要な役割を担っていることを近年明らかにした。例えば、化石燃料の燃焼で生じる大気中親電子物

質の 1 つである 1,2-ナフトキノン (1,2-NQ) が、PTP1B の Cys121 に結合することで EGFR のリン酸化を亢進することを見出した (Iwamoto N et al., J Biol Chem, 2007)。一方、細胞内に侵入した 1,2-NQ は速やかに Keap1 (転写因子 Nrf2 を負に制御している感知・応答センサー) の Cys151 と共有結合した結果、Nrf2 が活性化されることで 1,2-NQ の解毒・排泄に関わる下流遺伝子群の誘導が生じ、毒性防御に働くという細胞応答システ

ムの関与を明らかにした (Miura T et al., Chem Res Toxicol, 2011)。したがって、Keap1-Nrf2 システムは環境中親電子物質のリスク軽減因子として重要であることが示唆される。

ところで、生活環境中での揮発性物質の一部は化学物質過敏症の原因であることが知られている。興味あることに、揮発性物質の一部は親電子性を有している。当研究室では最近、米国カルフォルニア州・リバーサイド地区で採取した大気中揮発性成分が Keap1 に結合することで Nrf2 を活性化し、下流の解毒遺伝子群を誘導することを見出した (Iwamoto N et al., Atmos Environ, 2010)。この事実から、日常生活で使用されている化学物質過敏症を呈するような親電子物質に対しても、同様な生体応答システムが働いているのではないかと予想できる。これまでの報告から、皮膚過敏症を示すような親電子物質の中には、解離性チオール基ではなく解離性アミノ基にのみ共有結合するものが報告されていることから、細胞内には Keap1 以外にも解離性アミノ基で親電子物質を認識する感知・応答センサーが存在することが考えられる。しかし、解離性アミノ基に反応する親電子物質の反応性や、それに対する感知・応答センサーについての知見は乏しいのが現状である。

2. 研究の目的

生活環境中に存在する化学物質の一部は親電子性を有している。これまでの報告から、皮膚過敏症を示すような親電子物質の中には、解離性チオール基ではなく解離性アミノ基にのみ共有結合するものが報告されている。そこで、化学物質過敏症を呈する化学物質に対して生体が備えた感知・応答の防御システムを明らかにすることを最終的な目標とし、本研究ではモデル化合物を用いて解離性アミノ基と共有結合を形成する親電子物質の反応性に関する基礎的知見を得ることを目的とする。モデル化合物としては、香料の材料として用いられる 3,4-ジヒドロクマリン (3,4-DHC) を使用する。

3. 研究の方法

HPLC

HPLC-UV-VIS system は、システムコントローラー SCL-10A (島津)、送液ポンプ LC-10AD (島津)、脱気装置 UGD-12A (島津)、紫外可視検出器 SPD-10AV (島津) およびオートサ

ンプラー SIL-10AF (島津) からなり、これら全ての装置は LCsolution version 1.2 software (島津) により一括制御した。ガードカラムとして、YMC-Pack ODS-AM 用カートリッジカラム (23 × 4.0 mm i. d., YMC 社) を、カラムには YMC-Pack ODS-AM (250 × 4.6 mm i. d., YMC 社) を用いた。3,4-DHC および 3-(2-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸 (HPA) は 270 nm の吸収波長にて検出した。

UPLC-MS

UPLC-MS system は、送液ポンプ (試料用) Acquity UPLC Binary Soluvent Manager、送液ポンプ (標準物質用) 515 HPLC Pump (Waters 社)、カラムオーブン Acquity UPLC High Temperature Column Heater、オートサンプラー Acquity UPLC Autosampler Module および質量分析計 Synapt High Definition Mass Spectrometry (HDMS) system (Waters 社) からなり、これら全ての装置は MassLynx version 4.1 software により一括制御した。カラムには Acquity UPLC BEH C18 column (50 × 2.1 mm i. d.) を用いた。

アミノ基の定量

2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 法を用いた。Sigma 社から購入した keyhole limpet hemocyanin (KLH, 200 µg) と DMSO に溶解した 3,4-DHC (終濃度 10 or 40 mM) を全量 50 µL の 0.1 M KPi (pH 7.5) 中にて 25°C で 8 時間反応させた。その後、終濃度 1% の SDS を加え、0.1% TNBS と全量 500 µL にて 40°C で 30 分間反応させた。終濃度 0.1 M の HCl を加えて反応を停止させ、340 nm の吸収波長を分光光度計にて測定し、 $1.4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ のモル吸光係数よりアミノ基量を計算した。

ウサギポリクローナル抗 3,4-DHC 抗体の調製

KLH (20 mg) と DMSO に溶解した 3,4-DHC (終濃度 40 mM) を全量 5 mL の 0.1 M KPi (pH 7.5) 中にて 25°C で 8 時間反応させた。3,4-DHC と反応した KLH (3 mL) を 50 mM KPi (pH 7.5) で平衡化したエコノカラム 10DG (Bio-Rad 社) に付し、50 mM KPi (pH 7.5) (3 mL) で溶出し、未反応の 3,4-DHC を除去した。得られた 3,4-DHC-KLH 結合体を 3,4-DHC 抗原とし、ウサギ (2 羽) の背部皮下に 1 mg ずつ 2 週間おきに計 7 回感作させた。抗血清抗体価の測定は、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により行なった。ELISA プレートを用意し、KLH および 3,4-DHC-KLH 結合体を終濃度 0.05 µg/ml に

なるようにコーティング液で希釈して調製し、50 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ 96 well Maxisorp plate (Nunc) に滴下し、一晚 4°C で反応させた。溶液を除去し、PBS で洗った後、1% BSA 溶液を 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつコーティングした well に加えて 37°C で 30 分間反応させた。溶液を除去し PBS で洗った後、0.1% BSA-PBS を用いて抗血清希釈液 (1000, 3000, 9000, 27000, 81000, 243000, 729000, および 2187000 倍希釈) を作成し、50 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ加えて 37°C で 30 分間反応させた。抗血清希釈液を除去し、洗浄液を用いて 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ で 2 回洗浄後、HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Cell Signaling) を 0.1% BSA-PBS で 2500 倍希釈した後、50 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ加え、37°C で 30 分間反応させた。抗体溶液を除去し、洗浄液を用いて 100 $\mu\text{L}/\text{well}$ で 3 回洗浄した。ABTS 基質溶液の A 液と B 液を等量混合し、50 $\mu\text{L}/\text{well}$ ずつ加えて室温で 10 分間反応させた。50 $\mu\text{L}/\text{well}$ で Stop Solution (1% SDS) を加えた後、プレートリーダーにて 405 nm の吸光度を測定した。

タンパク質の定量

サンプルはビシンコニン酸 (BCA) 法によりタンパク定量を行った。すなわち、BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce) を用いて、50 容量の BCA 試薬 (A) と 1 容量の BCA 試薬 (B) を混合し、96 穴平底マイクロプレートに 20 容量の混合液に対して 1 容量のサンプルを加えて 37°C で約 1 時間反応させた後、プレートリーダーを用いて OD_{550} を測定した。標準タンパク質として BSA を用いて検量線 (0.5-2.5 mg/mL) を作成し、各試料のタンパク質濃度を決定した。

ウエスタンブロット

SDS-PAGE は Laemmli の方法に準じて行った。試料に 2-ME+BPB (10% グリセリン、10% 2-メルカプトエタノール、プロモフェノールブルー) を加え、3 分間 95°C でインキュベートして泳動サンプルを得た。電気泳動には泳動バッファー (2.5 mM Tris、19.2 mM グリシン、0.01% SDS) を用い、濃縮ゲル泳動中は 10 mA、分離ゲル泳動中には 25 mA の電流を PowerStation 1000VC (ATTO) を使用し泳動を行った。ウエスタンブロットは Kyhse-Anderson の方法に準じて行った。SDS-PAGE 法にて電気泳動したゲル中のタンパク質をホライズブロット (ATTO) を用いて PVDF 膜に転写した後、クロスパワー 500 (ATTO) を用い 2 mA/cm² の条件下で 1 時間転写を行った。PVDF 膜をブロッキングバッファー [5% スキムミルク-TTBS (20 mM Tris-HCl

(pH 7.5)、0.5 M NaCl、0.1% Tween 20)、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$] にてブロッキングし、希釈した 1 次抗体を 1 時間反応させた。反応後、PVDF 膜を TTBS にて 3 回洗浄し HRP 標識 2 次抗体を 1 時間反応させた。さらに TTBS にて 3 回洗浄し、ECL ウェスタンブロット検出試薬 Chemi-Lumi One (ナカライテスク) を用いて検出を行った。ECL の検出には LAS-4000 を用いた。

4. 研究成果

水溶液中における 3,4-ジヒドロクマリン (3,4-DHC) の反応性を検討したところ、緩衝液中において 3,4-DHC は時間依存的に分解され、3-(2-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸 (HPA) に変換された。この水解反応は pH7.5 の生理的条件下で緩やかに生じ、pH10 の塩基性条件下で速やかに進行した。3,4-DHC を緩衝液中でリジンおよびヒスチジンと反応させて LC-MS 解析を行ったところ、HPA の産生量は減少し、当該アミノ酸と 3,4-DHC との結合体のマスナンバーおよびそのフラグメントピークを示す新たなピークが現れた。このことから、3,4-DHC は水溶液中において HPA に水解される一方で、確かにリジンおよびヒスチジン残基と共有結合することが示唆された。

次に、3,4-DHC-タンパク質結合体を特異的に認識する抗体の作製を試みた。3,4-DHC をハプテンとした抗原を作製するために、キャリアー蛋白質として KLH を用いた。3,4-DHC と KLH を反応後、KLH のアミノ基の量を 2,4,6-トリニトロベンゼンスルホン酸を用いて測定したところ、有意なアミノ基量の減少が観察された。同条件下で KLH をトリプシン消化し、LC-MS/MS にて修飾部位の同定を行った結果、3,4-DHC は KLH 中のリジン残基のみを修飾していた。そこで必要量の 3,4-DHC-KLH 結合体を作製後、当該抗原を 2 週間おきに計 7 回ウサギに感作させた。得られた抗血清を段階希釈し、ELISA 法にて 3,4-DHC に対する抗体価を検討したところ、チトクロム C に対しては全く上昇が見られなかったが、3,4-DHC-チトクロム C 結合体に対して高い抗体価の上昇を認めた。抗血清は 3,4-DHC-KLH に対しても高い抗体価を示し、それは KLH に対する抗体価と比較してもアフィニティーが 2 倍以上高かった。すなわち、抗体価の高い抗 3,4-DHC 抗体の作製に成功した。そこで 3,4-DHC にヒト扁平上皮由来 A431 細胞を曝露したところ、濃度依存的な 3,4-DHC 修飾タンパク質の増加がウエスタン

プロットにて検出できたことから、本抗体は 3,4-DHC の標的タンパク質を探索する有用なツールであると言える。現在、3,4-DHC に曝露した細胞のタンパク質を 2 次元電気泳動後、細胞内にて 3,4-DHC の標的となるセンサータンパク質を探索中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- 1) Kumagai Y, Shinkai Y, Miura T, Cho AK. The chemical biology of naphthoquinones and its environmental implications. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 52: 221-247, 2012, 査読有.
DOI:10.1146/annurev-pharmtox-010611-134517
- 2) Shinkai Y, Iwamoto N, Miura T, Ishii T, Cho AK, Kumagai Y. Redox cycling of 1,2-naphthoquinone by thioredoxin1 through Cys32 and Cys35 causes inhibition of its catalytic activity and activation of ASK1/p38 signaling. Chemical Research in Toxicology, 25: 1222-1230, 2012, 査読有.
DOI : 10.1021/tx300069r

[学会発表] (計 5 件)

- 1) 藤江智也, 中寛史, 立浪忠志, 山本千夏, 廣岡孝志, 安池修之, 新開泰弘, 熊谷嘉人, 内山 真伸, 鍛冶利幸. 有機-無機ハイブリッド分子による生体防御系の活性化. 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 28 日, 横浜
- 2) Abiko Y. Activation of Nrf2 caused by tert-butylbenzoquinone, a metabolite of butylated hydroxyanisole, requires electrophilic modification of Keap1 through its reactive thiols. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology, 2012 年 7 月 20 日, 仙台
- 3) 新開泰弘. 有害金属の毒性に対する防御応答を担う細胞応答システム. 第 39 回日本毒性学会学術年会, 2012 年 7 月 18 日, 仙台 (招待講演)
- 4) 熊谷嘉人. タンパク質と共有結合する

- 薬毒物の生体反応とそれに対する細胞の防御戦略. 安全性評価研究会セミナー, 2011 年 12 月 3 日, 東京 (招待講演)
- 5) 熊谷嘉人. 環境中親電子物質によるタンパク質の化学修飾を制御する細胞内システム. 九州大学・生体防御医学研究所 共同利用研究集会, 2011 年 7 月 22 日, 福岡 (招待講演)

[その他]

ホームページ等

http://www.md.tsukuba.ac.jp/environmental_medicine/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊谷 嘉人 (KUMAGAI YOSHITO)
筑波大学・医学医療系・教授
研究者番号 : 00250100

(2) 研究分担者

新開 泰弘 (SHINKAI YASUHIRO)
筑波大学・医学医療系・助教
研究者番号 : 10454240